

ラット carboxymethyl cellulose ポーチによる MRSA の感染実験

—当院で分離された MRSA 株の病原性と治療に関する実験的検討—

川島 崇・竹本 淳紀・塚田 弘樹

長谷川隆志・和田 光一・荒川 正昭

新潟大学医学部第二内科学教室*

(平成5年10月26日受付・平成6年2月25日受理)

ラット carboxymethyl cellulose (CMC) ポーチ法は、炎症を定量的に評価しうる点で優れており、感染実験モデルとしても応用されている¹⁾。今回、我々は、この方法を用いて黄色ブドウ球菌感染症に対する抗生剤の評価を行い、有用と思われたので報告する。CMC ポーチによる感染実験では、感染炎症のあるポーチ内の cefotiam (CTM), imipenem/cilastatin (IPM/CS), vancomycin (VCM) の濃度は、血中濃度より高値で、いずれの薬剤も移行は良好であったが、3薬剤の中では、VCM がもっとも良好に移行し、かつ持続した。*Staphylococcus aureus* Smith 株の感染実験では、IPM/CS と VCM は、同等の効果を示した。また、臨床分離 MRSA に対しては、MIC を反映して、VCM は有効であったが、IPM/CS と CTM は、効果が見られなかった。薬剤感受性試験では、IPM/CS と CTM の併用において、IPM 0.39 $\mu\text{g/ml}$, CTM 6.25 $\mu\text{g/ml}$ で、FIC index 0.031 と、良好な菌であるにも関わらず、本実験系では、効果が認められなかった。その原因としては、感染局所において、2種類の薬剤を、効果が期待される一定の濃度比とし持続することが困難であるためと思われた。また、今回の結果より MRSA の治療では、早期より VCM を使用すれば、MSSA と同様の治療効果が得られる可能性が示唆された。本実験感染症モデルは、菌の増殖のみでなく、それに対する生体の反応も含め、感染に対する抗生剤の *in vivo* 効果を評価できる有用な系であると考えられた。

Key words: air pouch inflammation, MRSA, MSSA, VCM, IPM/CS+CTM

ラット carboxymethyl cellulose (CMC) ポーチ法は、炎症を定量的に評価しうる点で優れており^{2,3)}、感染実験モデルとしても応用されている^{1,4)}。今回、我々は、この方法を用いて、黄色ブドウ球菌感染症に対する抗生剤の評価を行い、有用と思われたので報告する。

I. 材料と方法

1) 薬剤

Sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na) は、第一工業製薬(京都、日本)より購入した。抗生剤としては、cefotiam (CTM, 武田製薬より供与), mipenem/cilastatin (IPM/CS, 萬有製薬より供与), vancomycin (VCM, 塩野義製薬より供与) を使用した。

2) 動物

体重90~110gのSD系SPE雄性ラットをチャー

ルス・リバー(厚木、日本)より購入し、約1週間の予備飼育の後、実験に使用した。

3) 使用菌株

Staphylococcus aureus Smith 株、および新潟大学医学部第二内科にて分離された methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA NK 901株)である。

S. aureus Smith 株の MIC は、VCM 0.78 $\mu\text{g/ml}$, IPM 0.013 $\mu\text{g/ml}$ であった。

MRSA NK 901 株の各種抗生剤に対する感受性 (MIC) は、VCM 0.78 $\mu\text{g/ml}$, IPM 25 $\mu\text{g/ml}$, CTM 400 $\mu\text{g/ml}$ で、IPM と CTM との併用により、IPM 0.39 $\mu\text{g/ml}$, CTM 6.25 $\mu\text{g/ml}$ と低下し、FIC index も 0.031 と良好な菌株であった。

4) 感染実験

既報のラット carboxymethyl cellulose ポーチに

* 新潟県新潟市旭町通1-754

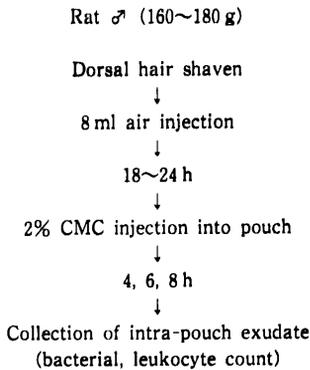


Fig. 1. Pouch formation and induction of infection in rat.

よる MRSA の感染実験で行った¹⁾。すなわち、ラット背部の皮毛を電気バリカンで除去し、21 G の注射針をラット背部皮下に刺入し、8 ml の空気を注入して、Fig. 1 のような卵型の空気嚢を作製した。翌日、滅菌した 2% CMC-Na の生理食塩水に、所定の菌数を含む感染菌液を混合した懸濁液 4 ml を注入して、感染炎症を惹起した。

所定の時間に、エーテル麻酔下でラットを脱血死させ空気嚢を開放し、浸出液を採取し、液量、生菌数、白血球数を測定した。生菌数は、採取した浸出液を、蒸留水、生食水で希釈し、寒天平板に 0.1 ml 塗布して培養後に、生じたコロニー数から生菌数を算定した。

白血球数は、採取した浸出液を、チュルク液で希釈して血算盤にて計数した。1 群 5 匹を用いた。

5) 抗生剤の投与と濃度の測定

抗生剤は、菌液注入直後に、尾静脈より注入した。使用した抗生剤は、CTM 40 mg/kg、IPM/CS 10 mg/kg と VCM 20 mg/kg で、control として生理食塩水を用いた。

所定の時間に、採血および、空気嚢より浸出液を採取し、抗生剤の濃度を測定した。1 群 5 匹を用いた。

6) 抗生剤による治療効果の検討

S. aureus Smith 株および MRSA NK 901 株を使用して感染実験を行った。IPM/CS 10 mg/kg 静注群、VCM 20 mg/kg 静注群、コントロール群の 3 群に分けて治療効果を検討した。

II. 成 績

1) 薬剤濃度 (Table 1)

CTM 40 mg/kg 静注後の薬剤の血中濃度は、1 時間後 1.56 $\mu\text{g/ml}$ で、2 時間後は 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 以下で

Table 1. Drug concentration

Cefotiam ($\mu\text{g/ml}$)	(40 mg/kg i.v.)		
	1 h	2 h	4 h
Pouch	6.74 \pm 1.15	1.81 \pm 0.46	ND
Serum	1.56 \pm 0.37	ND	ND

ND: Not detected (ND<0.625)

Imipenem/cilastatin ($\mu\text{g/ml}$)	(10 mg/kg i.v.)		
	1 h	2 h	4 h
Pouch	7.02 \pm 0.81	1.63 \pm 0.42	ND
Serum	1.05 \pm 0.26	ND	ND

(ND<0.20)

Vancomycin ($\mu\text{g/ml}$)	(20 mg/kg i.v.)		
	1 h	2 h	4 h
Pouch	20.7 \pm 2.07	12.7 \pm 1.23	4.32 \pm 0.74
Serum	15.2 \pm 2.99	3.2 \pm 0.85	ND

(ND<0.60)

あった。ポーチ内濃度は、1 時間後 6.74 $\mu\text{g/ml}$ 、2 時間後 1.81 $\mu\text{g/ml}$ で、4 時間後は 0.625 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。

IPM/CS 10 mg/kg 静注後の薬剤の血中濃度は、1 時間後 1.05 $\mu\text{g/ml}$ で、2 時間後は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。ポーチ内濃度は、1 時間後 7.02 $\mu\text{g/ml}$ 、2 時間後 1.63 $\mu\text{g/ml}$ で、4 時間後は 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。

VCM 20 mg/kg 静注後の薬剤の血中濃度は、1 時間後 15.2 $\mu\text{g/ml}$ 、2 時間後は 3.2 $\mu\text{g/ml}$ で、4 時間後は 0.6 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。ポーチ内濃度は、1 時間後 20.7 $\mu\text{g/ml}$ 、2 時間後 12.7 $\mu\text{g/ml}$ で、4 時間後は 4.32 $\mu\text{g/ml}$ であった。

いずれの薬剤も、感染炎症のあるポーチ内への移行は、血中濃度より高値で良好であったが、3 剤の中では、VCM がもっとも良好に移行し、かつ持続した。

2) *S. aureus* Smith 株による感染実験 (Tables 2, 3)

S. aureus Smith 株の 2.8×10^7 CFU/rat の注入で、control 群は、4 時間後 10.16×10^6 CFU、6 時間後 7.47×10^6 CFU であったが、VCM 群は、4 時間後 2.58×10^6 CFU、6 時間後 0.68×10^6 CFU、IPM 群は、4 時間後 2.56×10^6 CFU、6 時間後 0.81×10^6 CFU で、コントロールに比べ有意に菌量の減少を認めた。VCM 群と IPM 群との間には、差は認められなかった。また、浸出細胞数にも、差が見られなかった。なお、浸出細胞は、好中球が 90% 以上であった。

Table 2. Number of bacteria in pouch ($\times 10^6$)

	0 h	4 h	6 h
Control	28.0	10.16 \pm 1.08	7.47 \pm 1.73
VCM	28.0	2.58 \pm 0.39*	0.68 \pm 0.17*
IPM/CS	28.0	2.56 \pm 0.39*	0.81 \pm 0.11*

* P<0.01 vs control

VCM: vancomycin, IPM/CS: imipenem/cilastatin

Table 3. Number of infiltrated cells in pouch ($\times 10^7$)

	4 h	6 h
Control	9.43 \pm 1.23	16.08 \pm 0.73
VCM	9.34 \pm 0.98	15.73 \pm 1.64
IPM/CS	10.86 \pm 1.03	18.01 \pm 1.39

VCM: vancomycin, IPM/CS: imipenem/cilastatin

Table 4. Number of bacteria and infiltrated cells 4 hours after inoculation of bacteria in pouch ($\times 10^7$)

	Bacteria	Infiltrated cells
Control	4.81 \pm 0.56	11.64 \pm 0.81
CTM	4.91 \pm 1.01	13.03 \pm 0.49
IPM/CS	3.90 \pm 0.30	11.81 \pm 0.54
VCM	1.42 \pm 0.26*	10.14 \pm 0.35
IPM/CS+CTM	3.36 \pm 0.31	9.54 \pm 0.44

* P<0.01 vs control

CTM: cefotiam, IPM/CS: imipenem/cilastatin, VCM: vancomycin

3) MRSA NK 901 株による感染実験 (Table 4) MRSA の 9.5×10^7 CFU/rat の注入で, control 群は, 4 時間後 4.81×10^7 CFU であったが, VCM 群は, 4 時間後 1.42×10^7 CFU で, 有意に菌量の減少を認めた。IPM 群は, 4 時間後 3.90×10^7 CFU, CTM 群は, 4 時間後 4.01×10^7 CFU で, コントロールと差は認められなかった。IPM/CS と CTM の併用群も, 4 時間後 3.36×10^7 CFU と菌量の減少は軽度で, コントロールに比べ, 有意差は認められなかった。

III. 考 察

CMC ポーチを用いた本実験系による我々の検討では, *S. aureus* Smith 株と MRSA 間では, 生菌数の変化, 浸出細胞数, 浸出液量に, 有意差は見られず, 炎症惹起能に差はないと考えている¹⁾。

本実験系では, いずれの薬剤も, 感染炎症のあるポーチ内への移行は, 血中濃度より高値で良好であったが, 3 剤の中では, VCM が感染局所へもっとも良好に移行し, 持続した。

CMC ポーチによる *S. aureus* Smith 株の感染実験に対して, VCM は, IPM/CS と同等の効果が認められた。臨床分離 MRSA に対しては, MIC を反映して, VCM は Smith 株と同等の効果を示した。一方, IPM/CS と CTM では, control と同様に効果が見られなかった。IPM/CS と CTM の併用による *in vitro* での薬剤感受性試験では, 被験菌の MIC は, IPM $0.39 \mu\text{g/ml}$, CTM $6.25 \mu\text{g/ml}$ で, FIC index 0.031 と, 良好であるにも関わらず, ポーチ内の菌増殖を抑える効果は認められなかった。その原因としては, 感染局所において, 2 種類の薬剤を, 一定の時間, もっとも有効と考えられる一定の濃度比とすることが困難であるためと思われる。

MRSA に対する治療では, 併用療法は, 臨床的に十分な効果が期待されるほどではなかった。一方, VCM は, MSSA において, もっとも有効と思われる IPM/CS と同様の効果を示すとともに, MRSA においても MSSA と同様の効果を示したことから, 臨床的にも十分な効果が期待できる。MRSA 感染症に対しては, 早期に VCM を使用することで, MSSA 同様の有効性が得られる可能性が示唆された。このことは, 他の感染実験でも示されている⁵⁾。

また, 本実験感染症モデルは, 菌の増殖のみでなく, それに対する生体の反応も含め, 感染に対する抗生剤の *in vivo* 効果を評価できる有用な系であると考えられた。

本論文の要旨は, 第 40 回日本感染症学会東日本地方会総会, 第 38 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会および第 39 回日本化学療法学会総会において発表した。

文 献

- 川島 崇, 竹本淳紀, 塚田弘樹, 長谷川隆志, 和田光一, 荒川正昭: ラットの空気嚢型炎症モデルを用いた感染実験: MRSA と MSSA の炎症惹起能の差。感染症誌 67: 747~752, 1993
- Tsurufuji S, Yosino S, Ohuchi K: Induction of an allergic air pouch inflammation in rats. Eur J Pharmacol. 117: 337~345, 1985
- Hasegawa T, Hirasawa N, Watanabe M, Arakawa M, Tsurufuji S, Ohuchi K: Characterization of methylated bovine serum albumin-induced allergic inflammation in rats. Int Arch Allergy Appl Immunol. 95: 35~41, 1991
- 安食洋子, 川田晴美, 飯島政子, 安田 紘, 岩田正之: ラット carboxymethyl cellulose ポーチによる新実験的感染症モデルの作製。Chemotherapy 38: 552~559, 1990
- French G L, Cheng A F B, Ling J M L, Mo

P, Donnan S: Hong Kong strains of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus*

aureus have similar virulence. J Hosp Infect. 15: 117~125, 1990

Experimental infection with MRSA in rat carboxymethyl cellulose pouch:
an experimental study on the pathogenicity of MRSA
and the treatment of MRSA infection

Takashi Kawashima, Atsunori Takemoto, Hiroki Tsukada,
Takashi Hasegawa, Kouiti Wada
and Masaaki Arakawa

Department of Medicine (II), Niigata University School of Medicine,
757 Ichiban-cho Asahimachi-dori, Niigata-shi 951, Japan

The rat carboxymethyl cellulose (CMC) pouch, which has the advantage of allowing quantitative evaluation of inflammation, is utilized as an experimental model of infection. We used this model in the assessment of antibiotics against infections with *Staphylococcus aureus*, and obtained some valuable data. In the CMC pouch with inflammation due to an infection, cefotiam, imipenem/cilastatin and vancomycin attained a higher concentration than the blood concentration, which indicated that all drugs were absorbed well into the pouch. Of the three drugs, vancomycin (VCM) attained the highest pouch concentration relative to its blood level and stayed the longest. In the pouch infected with *Staphylococcus aureus* Smith, imipenem/cilastatin (IPM/CS) and VCM were equally effective. In that infected with clinically isolated methicillin-resistant *S. aureus*, VCM was effective, reflecting its minimal inhibitory concentration, while IPM/CS and cefotiam (CTM) produced no effect. The combination of 0.39 μg of IPM/CS per ml and 6.25 μg CTM per ml, while providing good results with fractional inhibitory concentration index at 0.031 in the drug sensitivity test, did not produce an appreciable effect in the present experimental system. This is probably because it was difficult to maintain the two drugs constantly in such a ratio of concentration as promised a favorable effect, in the local region. Our results also suggest that, in the treatment of MRSA infections, the early use of VCM might produce a therapeutic effect comparable to that against methicillin-sensitive *S. aureus*. The present experimental model of infection seemed useful as it allows evaluation not only of the effect against the growth of organisms but the effect on the response of the host as well, that is, it allows evaluation of the *in vivo* effect of the antibiotic.